论著

文章编号:1000-5404(2006)17-1746-03

可溶性HLA-G1抑制人自然杀伤细胞NK92对猪内皮细胞PED的黏附

王树森[1*],房崇云[2*],曾梦华[1],谢 林[1],李 荣[1],王 璐[1],朱 珉[1],吴雄文[2],陈 实[1] (华中科技大学同济医学院:[1]器官移植所,同济医院教育部器官移植重点实验室,[2]免疫学系,武汉 430030)

提 要:目的 研究可溶性HLA-G1(HLA-G5)对人自然杀伤细胞(NK细胞)黏附到猪血管内皮细胞(PED)的抑制作用,从而降低人NK细胞对猪血管内皮细胞杀伤杀伤活性。**方法** 利用核转染技术将pcDNA3-HLA-G5转入LCL721.221细胞株。以RT-PCR、Dot-ELISA技术分别在基因水平和蛋白水平检测HLA-G5的表达;以人类NK细胞系(NK92)效应细胞,猪内皮细胞系(PED)为靶细胞,检测NK92在静止和流动状态下对PED的黏附作用;四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测HLA-G5抑制NK细胞的杀伤活性。**结果** 与未加入HLA-G5的对照组相比,NK92在静止和流动状态下对PED的黏附功能明显降低($P<0.01$),且对HLA-G5组PED的杀伤效率均有明显下降($P<0.01$)。**结论** HLA-G5可以通过抑制NK92对PED的黏附功能,来减轻NK92对PED的杀伤作用。

关键词:HLA-G5;自然杀伤细胞;黏附;移植;异种;转基因

中图法分类号:R322.12;R392.12;R394.3 **文献标识码**:A

Soluble HLA-G1 inhibits xenotransplantation rejection through degrading NK92 to adhere to PED

WANG Shu-sen[1], FANG Chong-yun[2], ZENG Meng-hua[1], XIE Lin[1], LI Rong[1], WANG Lu[1], ZHU Min[1], WU Xiong-wen[2], CHEN Shi[1] ([1]Institute of Organ Transplantation, Tongji Hospital, [2]Department of Immunology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: Objective To study the inhibitory effect of soluble HLA-G1 (HLA-G5) on xenotransplantation rejection through degrading the role of NK92 to adhere to PED. **Methods** The recombinant expression vector pcDNA3-HLA-G5 was transfected into the lymphoblastoid cell line LCL721.221 by nucleofection. The expression of HLA-G5 in the transfected LCL721.221 was detected by RT-PCR and Dot-ELISA technique. NK cell line (NK92) was used as NK effect cells and the porcine aortic endothelial cells line (PED) as targets. The cytotoxicity of NK92 was analyzed by MTT. **Results** HLA-G5 conferred significance in degrading the role of NK92 to adhere to PED ($P<0.01$), and protected PED against NK2 medicated lysis. The rate of NK92 cell cytotoxicity was reduced to 25.5% as compared to 71.2% in the control group ($P<0.01$). **Conclusion** HLA-G5 can degrade the role of NK92 to adhere to PED, and directly protect PED against NK92, indicating that HLA-G5 may be useful to prevent human NK cells responding to porcine xenografts.

Key words: HLA-G5; natural killer cells; adherence; transplantation; xenograft; transgenes

猪-人异种器官移植后,不可避免会发生严重的异种排斥反应。研究表明,自然杀伤细胞(NK细胞)介导的异基因细胞毒性作用在上述排斥反应中起着十分重要的作用。NK细胞具有活化、黏附靶细胞的功能,通过受体-配体结合黏附到靶细胞,发挥细胞毒性作用[1,2]。人类NK细胞通过黏附到猪血管内皮细胞,发挥细胞毒性作用,介导猪-人异种移植血管性排斥反应[3]。HLA-G属于非经典的主要组织相容性复合物(MHC)I类分子,主要表达在胎盘绒毛膜细胞等部位,胎盘绒毛膜细胞可以大量分泌可溶性HLA-G1(HLA-G5)。HLA-G5分子可以通过与NK细胞表面的抑制性受体(KIR)结合,启动NK细胞抑制性信号

基金项目:国家"863"高技术发展计划基金资助项目(2003-AA-205092)
Supported by the National "863" High-Tech Development Plan of China (2003-AA-205092)
*:同等贡献者
作者简介:王树森(1976-),男,内蒙古海拉尔市人,博士研究生,主要从事器官移植方面的研究。电话:(027)67117077, E-mail: wangshusen369@163.com
通讯作者:陈 实,E-mail:Schen@tjmu.tjh.edu.cn
吴雄文,E-mail: xiongwenwu@hotmail.com
收稿日期:2005-09-20;修回日期:2006-01-15

传导通路。在维持母胎耐受方面起重要作用[4-6]。因此本实验以 NK92 细胞为效应细胞，猪内皮细胞系 PED 为靶细胞，以研究在 HLA-G5 抑制 NK92 黏附 PED 介导的杀伤活性。

1　材料与方法

1.1　主要试剂及材料

α-MEM 培养基、DMEM 培养基、RMPI1640 培养基及胎牛血清、马血清、G418、Trizol RNA 分离试剂盒、逆转录酶 Superscript Ⅲ Rnase H（Gibco 公司）；核转染试剂（Amaxa 公司）；四甲基偶氮唑盐（Fluka 公司）；HLA-G5 特异性单克隆抗体 MEM-G/9（Serotec 公司）；HRP 标记的羊抗鼠抗体（北京中山生物技术有限公司）；rhIL-2（长春生物制品研究所）；HLA-G5 真核表达质粒、人类 NK 细胞系（NK92）、LCL721.221 细胞系、HLA-I 类分子单抗 W6/32（华中科技大学同济医学院免疫学研究所）；猪血管内皮细胞系 PED 由瑞典 Karolinska 大学 Holgersson 教授惠赠。

1.2　细胞培养

①NK92 细胞以含 12.5% 胎牛血清、12.5% 马血清和 100～200 U/ml rhIL-2 的 α-MEM 培养基，37 ℃，5% CO_2 常规培养；②PED 细胞在 37 ℃、5% CO_2 条件下培养于含 10% 胎牛血清 DMEM 中；③LCL721.221 细胞在 37℃、5% CO_2 条件下培养于含 15% 胎牛血清的 RMPI1640 中。（LCL721.221 细胞系不表达 HLA-I 类分子的重链，但表达 β_2 微球蛋白。因此，重组质粒进入细胞后，其所表达 HLA-G1 分子重链能与宿主细胞本身 β_2 微球蛋白组装，形成完整的 sHLA-G1 分子，是研究 HLA 分子的良好工具细胞。）

1.3　核转染

将核转染试剂盒中的 solution V 和 Supplement 按 4.5∶1 的比例配制，核转缓冲液 100 μl 中加入质粒 pcDNA3-HLA-G5 3 μg，转入含 1×10^6 LCL721.221 细胞的 EP 管中，混匀后将悬液加入核转杯中，采用核转仪固化程序 A-23 进行核转染。转染 24 h 后，用 800 μg/ml G418 筛选 7 d，获得稳定转染体，400 μg/ml G418 维持，扩大培养。收获上清，应用 HLA-I 类分子单抗 W6/32，借助免疫亲和层析技术纯化上述转染细胞培养上清中的 HLA-G5。

1.4　RT-PCR 检测 HLA-G5 的表达

采用 Trizol 试剂，从筛选出的细胞中提取总 RNA，采用逆转录酶 Superscript Ⅲ Rnase H^- 获得 cDNA，同时以未转染细胞为对照。RT-PCR 及逆转录反应参照试剂盒说明。HLA-G5 引物：P1：5′-CCCGGTACCCAAGGATGGTGGTCATGGCGC-3′，P2：5′- CCCTCTAGAACCGACCCTGTTAAAGGTCT-3′；PCR 温度循环参数如下：94 ℃，5 min；94 ℃，40 s；62 ℃，1 min；72 ℃，1 min；35 个循环后 72 ℃延伸 10 min，预计扩增产物长 994 bp。同时以人类 β-actin 作为内参照，以对 RT-PCR 过程进行质量监控，其引物为：P1：5′-AGCTGCGTGTGGCTCCCGAG-3′；P2：5′-TCTC-CTTAATGTCACGCACG-3′，扩增产物片段为 366 bp。反应结束后，取 5 μl PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶中电泳。

1.5　Dot-ELISA

取转染和未转染的 LCL721.221 细胞各 3×10^6 个，于 1 ml 无血清培养基中培养 24 h，800 × *g* 离心 10 min，收集上清，各取 5 μl 上清，点于 NC 膜上，4 ℃ 8 至 10 h。一抗为 HLA-G5 特异性单克隆抗体 MEM-G/9（10 μg/ml），37 ℃湿盒孵育 1 h；二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体（1∶2 000），37 ℃湿盒孵育 1 h。

1.6　细胞黏附实验

1.6.1　静止黏附实验　①将 PED 以 10^5/孔的密度转至 24 孔板。生长呈致密单层后，预温 PBS 洗 1 次。②将 NK92 调整浓度至 2×10^5/ml，加入 24 孔板中，每孔 0.2 ml。置 37℃、5% CO_2 培养箱孵育 20 min。③ 按上述方法计数。

1.6.2　流动黏附实验[7]　① 细胞培养步骤同静止黏附实验。② 将 24 孔板放入杂交箱中，以 64 r/min 转速 37 ℃条件下培养 20 min，模拟体内具有一定剪切力作用下，NK 细胞和内皮细胞间的黏附作用。③按上述方法计数。

其中实验组加入终浓度 2μg/ml 的 HLA-G5。

1.7　NK 细胞杀伤活性的检测

采用四甲基偶氮唑盐（MTT）法[8]。效应细胞为 NK92，靶细胞为 PED，按效靶比为 10∶1 将 NK92 与 PED 孵育 6 h，其中实验组加入终浓度 2 μg/ml 的 HLA-G5，酶标仪进行分析处理。

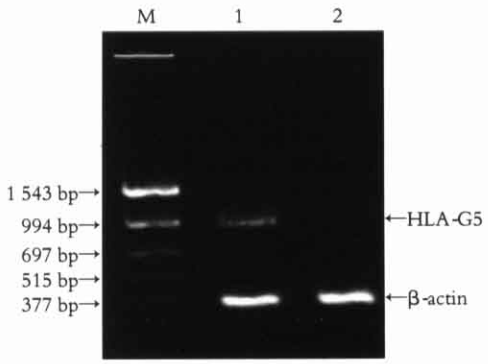
1.8　统计学处理

应用 SPSS 12.0 软件进行 *t* 检验。

2　结果

2.1　RT-PCR 检测 HLA-G5 的表达

分别以转染细胞和未转染细胞总 RNA 为模板，进行 RT-PCR。结果如图 1 所示。可见：转染组和未转染组均有 β-actin 扩增产物，表示逆转录过程和 PCR 过程均成功；转染组有一长约 994 bp 的带，说明转染细胞有 HLA-G5 基因的表达。



M：PCR 标准；1：未转染组；2：转染组

图 1　RT-PCR 检测 HLA-G5 的表达

2.2　Dot-ELISA

检测结果如图 2 所示：A 为转染细胞上清，可见明显着染；B 为未转染细胞上清，不显色。结果表明：转染细胞上清中含 HLA-G5。



A：转染细胞上清；B：未转染细胞上清

图2 Dot-ELISA 检测转化细胞上清中 HLA-G5 表达

2.3 HLA-G5 对 NK92 黏附功能的抑制作用

结果如表1所示，HLA-G5 可以明显抑制 NK92 在静止、滚动状态下对 PED 的黏附作用（$P<0.01$），具有极显著意义。

表1 HLA-G5 对 NK92 黏附到猪内皮细胞的抑制作用

组别	n	NK92 黏附细胞数（$\bar{x}\pm s$）	
		HLA-G5 组	对照组
静止黏附	6	129.8±8.8	260.5±9.9
滚动黏附	6	48.2±7.3	139.3±8.4

静止黏附（$t=29.5817$，$P=.0000008277$）

滚动黏附（$t=18.7553$，$P=.0000079349$）

2.4 HLA-G5 对 NK92 细胞杀伤活性的抑制作用

NK92 和 PBMC 对加入 HLA-G5 组 PED 的杀伤效率（25.5±2.1）均明显低于对照组（71.2±2.6）（$t=32.8389$，$P<0.01$），具有极显著意义。

3 讨论

实验表明 NK 细胞可以介导强烈的异种排斥反应，导致异种移植物失活。因此，克服异种排斥反应的发生，就必须找到有效抑制 NK 细胞介导的异种排斥反应的方法。猪-人血管化异种移植后，滚动黏附是捕获循环血液中 NK 细胞的主要机制[9,10]，之后通过稳定黏附，跨内皮细胞迁移，浸润到猪器官组织中，引发细胞毒性作用。

HLA-G 可以在一定程度上降低 NK 细胞介导的杀伤作用，这种抑制作用可能在一定程度上是因为 HLA-G 抑制了 NK 细胞对 PED 的黏附功能。因此本实验分别在静止和滚动的状态下，全面研究 NK92 细胞的黏附功能以及 HLA-G5 对 NK92 的黏附功能的影响。实验的结果显示 HLA-G5 可以在静止和滚动的状态下，明显降低 NK92 对 PED 的黏附功能。MTT 杀伤实验的结果也进一步显示，降低 NK92 的黏附功能可以显著降低 NK92 对 PED 的杀伤作用，二者呈相关关系。同时本研究小组还发现 HLA-G5 可以在很大程度上抑制 NK92 释放穿孔素、颗粒酶等细胞毒性物质（未发表资料），所以可以肯定 HLA-G5 至少通过以上两种机制发挥了对 NK92 杀伤 PED 的抑制作用。目前对于 HLA-G 的研究主要集中于跨膜型 HLA-G（HLA-G1），Forte 等[11]的实验表明，表达 HLA-G1 的猪血管内皮细胞可以明显抑制 NK92 细胞的黏附功能，从而降低 NK92 细胞的杀伤活性。而针对 HLA-G5 在移植领域的研究却罕有报道。本实验的结果显示 HLA-G5 可以通过抑制 NK92 对猪内皮细胞的黏附作用，从而在抑制人 NK 细胞所介导的异种排斥反应中发挥着十分重要的作用。

遗憾的是，本实验结果提示，HLA-G5 并不能完全抑制人 NK92 细胞对 PED 的黏附作用和杀伤活性，提示在母胎耐受的机制中还存在其他抑制 NK 细胞生物学活性的途径，另外 NK 细胞还可以激活内皮细胞、分泌细胞因子等，这些机制中 NK 细胞的活化可能由多种因素引起。是否 HLA-G5 可以干扰人 NK 细胞的这些生物学活性还需进一步研究。

参考文献：

[1] KNOSALLA C, COOPER D K. Xenotransplantation and tolerance[J]. Front Biosci, 2002, 7: d1280-d1287.

[2] PLATT J L. The immunological hurdles to cardiac xenotransplantation [J]. J Card Surg, 2001, 16(6): 439-447.

[3] SCHNEIDER M K, FORTE P, SEEBACH J D. Adhesive interactions between human NK cells and porcine endothelial cells[J]. Scand J Immunol, 2001, 54(1-2): 70-75.

[4] THELLIN O, COUMANS B, ZORZI W, *et al*. Tolerance to foeto-placental 'graft': ten ways to support a child for nine months[J]. Curr Opin Immunol, 2000, 12(6): 731-737.

[5] ISHITANI A, GERAGHTY D E. Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992, 89(9): 3947-3951.

[6] PFEIFFER K A, REBMANN V, PASSLER M, *et al*. Soluble HLA levels in early pregnancy after *in vitro* fertilization[J]. Hum Immunol, 2000, 61(6): 559-564.

[7] FROHLICH D, SPERTINI O, MOSER R. The Fcgamma receptor-mediated respiratory burst of rolling neutrophils to cytokine-activated, immune complex-bearing endothelial cells depends on L-selectin but not on E-selectin[J]. Blood, 1998, 91(7): 2558-2564.

[8] 李爱玲，孙 沟，张建华，等. NK 细胞系细胞毒效应 MTT 比色法优化条件探讨[J]. 中国免疫学杂志，2002，18(10)：687，689.

[9] HOLGERSSON J, EHRNFELT C, HAUZENBERGER E, *et al*. Leukocyte endothelial cell interactions in pig to human organ xenograft rejection[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2002, 87(3-4): 407-415.

[10] INVERARDI L, CLISSI B, STOLZER A L, *et al*. Human natural killer lymphocytes directly recognize evolutionarily conserved oligosaccharide ligands expressed by xenogeneic tissues[J]. Transplantation, 1997, 63(9): 1318-1330.

[11] FORTE P, PAZMANY L, MATTER-REISSMANN U B, *et al*. HLA-G inhibits rolling adhesion of activated human NK cells on porcine endothelial cells[J]. J Immunol, 2001, 167(10): 6002-6008.

（编辑 王 红）